

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

HPLC ANALÝZA BENZIMIDAZOLŮ S VYUŽITÍM CORE-SHELL
KOLON I

Diplomová práce

HPLC ANALYSIS OF BENZIMIDAZOLES USING CORE-SHELL
COLUMNS I

Diploma thesis

Vedoucí diplomové práce: ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové 2012

Kateřina Oslejová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Obrázky jsou použity se svolením autorů. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Kateřina Oslejová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce
Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za jeho podporu a mnoho cenných rad při vedení
diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za morální i finanční podporu při studiu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Kateřina Oslejová

Školitel: ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: HPLC analýza benzimidazolů s využitím core-shell kolon I

Cílem této práce bylo převedení starší metody HPLC analýzy flubendazolu a jeho metabolitů, např. redukovaného flubendazolu, z klasické kolony C18 (250×3,0 mm; 5 μm) na kolonu Ascentis® Express C18 (10×3,0; 2,7 μm) a nalezení vhodných vnitřních standardů.

Experimenty byly provedeny za použití kapalinového chromatografu Agilent 1200 Series® s DAD a fluorescenční detekcí. Flubendazol byl detekován DAD detektorem. Fluorescenčním detektorem byly detekovány nízké koncentrace redukovaného flubendazolu.

Bylo vyzkoušeno několik složení mobilních fází. Mobilní fáze složená z fosfátového pufru (pH = 3,0; 0,025 mol/l) a acetonitrilu (70/30, v/v) byla vhodná pro studovanou separaci. V závislosti na druhu detekce byly využívány různé vnitřní standardy. Mebendazol sloužil jako vnitřní standard v případě DAD detekce, zatímco oxibendazol byl využit pro detekci fluorimetrickou. Navržená metoda byla úspěšně aplikována při analýze reálných vzorků.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of biophysics and physical chemistry

Candidate: Kateřina Oslejová

Supervisor: ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of diploma thesis: HPLC Analysis of Benzimidazoles Using Core-shell Columns I

The aim of this work was to transfer the HPLC method of determination of flubendazole and its metabolite, i. e. reduced flubendazole, from a classical C18 column (250×3,0 mm; 5 µm) to core-shell column Ascentis[®] Express C18 (10×3,0; 2,7 µm) and to find a suitable internal standard.

Experiments were performed using liquid chromatograph Agilent 1200 Series[®] with both DAD and fluorescence detection. Flubendazole was detected with the DAD detector. Low concentrations of reduced flubendazole were detected with the fluorimetric detector.

Several mobile phase compositions were tested. The mobile phase consisting of phosphate buffer (pH = 3,0; 0,025 mol/l) and acetonitrile (70/30, v/v) appeared to be a good choice for the separation under study. Two internal standards were exploited for the quantification, depending on the detection principle. Mebendazole served as the internal standard in the case of DAD detection, while oxibendazole was utilized for fluorimetric detection. The proposed method was successfully applied for analyses of real samples.

Obsah

1.	CÍL PRÁCE	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1.	Anthelmintika	2
2.1.1.	Vývoj.....	2
2.1.2.	Léčiva používaná v dnešní medicíně	2
2.2.	Benzimidazoly	3
2.2.1.	Vývoj.....	3
2.2.2.	Mechanismus účinku	3
2.2.3.	Metabolismus benzimidazolů	4
2.2.4.	Způsob podání a biologická dostupnost	4
2.3.	Flubendazol.....	5
2.3.1.	Vlastnosti flubendazolu	5
2.3.2.	Mechanismus a spektrum účinku flubendazolu	5
2.3.3.	Metabolismus a distribuce flubendazolu	6
2.4.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	6
2.4.1.	Objev chromatografie.....	6
2.4.2.	Rozdělení chromatografických metod	7
2.4.3.	Základní pojmy	9
2.4.4.	Části kapalinového chromatografu	9
2.4.5.	Kvantitativní zpracování chromatogramů	12
2.4.6.	Využití HPLC	12
3.	Experimentální část	13
3.1.	Přístrojové vybavení.....	13
3.2.	Použité chemikálie	13
3.3.	Příprava pufrů	16
3.4.	Příprava vzorků benzimidazolů	17
3.5.	Metoda měření	17
4.	Výsledky a diskuze.....	18
4.1.	Měření při použití mobilní fáze kyselina octová (0,01 mol/l) a acetonitril	18
4.2.	Měření při použití mobilní fáze fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) a acetonitril	22
4.3.	Měření při použití mobilní fáze methanol a voda	24

4.4. Měření při použití mobilní fáze fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH = 3,0) a acetonitril	28
5. Závěr	41
6. Seznam použitých zkratek	42
Citovaná literatura	43

1. CÍL PRÁCE

Flubendazol je látka používaná ve veterinární medicíně. Patří do skupiny léčiv anthelmintika. V rámci výzkumu rezistence helmintů na benzimidazolová anthelmintika je třeba hledat vhodné podmínky HPLC analýzy těchto anthelmintik a jejich metabolitů. V pracovní skupině, sestávající z pracovníků tří kateder Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, která se uvedeným výzkumem zabývá, byla doposud při stanovení flubendazolu a jeho metabolitů používána HPLC metoda v klasickém uspořádání, to znamená s kolonou o rozměrech 250×4,6 mm plněnou zcela porézními částicemi C18 o zrnitosti 5 µm. (1) Délka analýzy dosahovala 25 min. Tato metoda používala v roli vnitřního standardu albendazol, což se ukázalo jako problematické, neboť albendazol ve vzorcích podléhal oxidaci a vznikající produkt (albendazol sulfoxid) rušil stanovení metabolitu redukovaného flubendazolu.

Zadáním této práce je dosažení dvou cílů. Za prvé je to převedení starší metody HPLC analýzy flubendazolu a jeho metabolitů na metodu za použití core-shell kolony Ascentis® Express C18 (10×3,0 mm; 2,7 µm). Za druhé je to nalezení vhodných vnitřních standardů pro dva různé způsoby detekce, detekci flubendazolu pomocí UV detektoru a detekci redukovaného flubendazolu pomocí detektoru fluorescenčního. Upravená metoda by měla poskytnout výhody menší časové náročnosti analýzy a použití vhodných chemicky stabilních vnitřních standardů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Anthelmintika

Helmintózy představují infekční onemocnění vyvolané červy nebo jejich infekčními stadii. U biohelmintóz probíhá vývojový cyklus červů ve vnitřním prostředí meziphostitelů a hostitelů a u geohelmintóz výhradně ve vnitřním prostředí hostitelů. Červi způsobují onemocnění lidí a hospodářských zvířat, u kterých tato onemocnění mívají často fatální následky a způsobují ekonomické ztráty. Nákazy se nejčastěji objevují v subtropických a tropických oblastech Afriky a Asie. V Evropě se také často vyskytují běžně určité druhy helmintů, některé druhy jsou však importovány. Tudiž se i ve střední Evropě můžeme setkat s velmi exotickými zástupci parazitů. (2)

2.1.1. Vývoj

Od dob prvních léčitelů se k léčbě parazitóz používaly rostlinné extrakty – silice hořčičná, silice merlíku vonného apod. Preparáty byly často nespolehlivé. Proto se ve 20. století značně vyvinula snaha o izolaci účinných látek. První z izolovaných látek byla kyselina glicinová z kapradě samce (*Dryopteris filix-mas*), účinná proti tasemnicím. Proti škrkavkám byl získán terpenický endoperoxid askaridol z merlíku vonného (*Chenopodium ambrosioides*). Proti motolicím má velkou účinnost alkaloid emetin.

Kromě látek přírodního původu mají velký význam látky syntetického původu. První syntetické látky byly toxické a poměrně málo účinné – sloučeniny cínu, chlorované alifatické uhlíky; nebo vyžadovaly několikadenní léčbu – piperazin a jeho deriváty. Amidové deriváty jsou prvními širokospektrálními anthelmintiky účinnými při jednorázovém podání. (3)

2.1.2. Léčiva používaná v dnešní medicíně

Mezi anthelmintika patří velké množství různorodých látek, které slouží k prevenci a léčbě helmintóz u zvířat. Léčiva jsou většinou syntetického, částečně biosyntetického původu. Léčí se jimi nejčastěji napadení třemi třídami červů – Nematoda (oblí červi, hlístice), Trematoda (ploší červi, motolice) a Cestoda (tasemnice). Podle účinku látek

následně rozlišujeme tři skupiny léčiv – antinematoda, antitrepatoda a anticestoda. Hranice mezi skupinami léčiv nejsou přesně ohraničené, některá léčiva se nacházejí ve více než jedné skupině. Nejčastěji se léčiva kombinují, aby se dosáhlo spolehlivějšího účinku. (4) (5)

Mezi nejvýznamnější anthelmintika patří benzimidazoly (flubendazol, fenbendazol, mebendazol a febantel), makrocyclické laktony (moxidectin, selamectin a milbemycinoxim), pyrazinové deriváty (epsiprantel a proaziquantel), tetrahydropyrimidiny (pyrantel a oxantel), imidazothiazoly (levamizol), salicylanilidy (niklosamid) a izothiokyanáty (nitroscanat). Některá léčiva se používají i k léčbě helmintóz v humánní medicíně. (5)

2.2. Benzimidazoly

Skupina benzimidazolových anthelmintik je nejrozsáhlejší skupinou léčiv odvozených od jedné chemické struktury. Patří mezi často používaná léčiva. Kvůli narůstající rezistenci helmintů na léčbu, se často dnes využívá kombinace benzimidazolů s jinými léčivy. Některé látky mají široké spektrum účinku, které zahrnuje nematoda, trematoda i cestoda. Nejvíce léčiv však patří mezi antinematoda.

2.2.1. Vývoj

Benzimidazoly patří mezi první moderní vyspělá anthelmintika. V roce 1961 byl poprvé představen thiabendazol. Ačkoliv je mírně toxický, byl velmi hojně využíván. Časem thiabendazol ale nahradila jiná, méně toxická léčiva, např. parbendazol, cambendazol, mebendazol, oxibendazol aj. Zavedením sulfidových a sulfoxidových funkčních skupin do struktury benzimidazolů se zavedla do terapie helmintóz nová léčiva, např. albendazol, oxfendazol a fenbendazol. Tato léčiva jsou bezpečnější, účinnější a mají větší spektrum účinku. (6)

2.2.2. Mechanismus účinku

Účinkují přes vazbu s β -tubulinovými subjednotkami nezbytnými pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. To má za následek inhibici transportu a metabolismu glukózy. Dochází k energetickému vyčerpání a ztrátě pohyblivosti parazitů a jejich

následnému odumření. Léčiva mají velmi nízkou afinitu k β -tubulinu buněk ošetřovaných zvířat, což umožňuje podání léčiva zvířeti bez nežádoucích účinků. Tiabendazol také inhibuje fumarátdehydrogenázu – enzym specifický pro helminty. Albendazol a mebendazol blokují příjem glukosy a snižují tvorbu glykogenu a ATP. Důsledkem je energetické vyčerpání organismu parazita, ztráta jeho pohyblivosti a jeho odumření. Většina léčiv působí na dospělá i vývojová stadia parazitů, některá jsou účinná i proti ovocidům. (3) (5)

2.2.3. Metabolismus benzimidazolů

Ze studií na zvířatech bylo zjištěno, že metabolismus benzimidazolů je velmi rozsáhlý. Metabolity se mohou nacházet v živočišných tkáních a v mléce a mohou se delší dobu ukládat v játrech, ledvinách, svalové a tukové tkáni. Umístění metabolitu v organismu závisí na původní struktuře léčiva.

Sulfidová struktura benzimidazolových léčiv (např. u albendazolu, fenbendazolu a triclabendazolu) je náchylná k oxidaci. Výsledkem oxidace jsou metabolity obsahující sulfoxidovou (SO) a sulfonovou (SO₂) skupinu. Mebendazol a flubendazol obsahují karbonylovou skupinu, která je metabolizovaná na hydroxyskupinu. Albendazol, fenbendazol, mebendazol a flubendazol obsahují karbamátovou skupinu, která je hydrolyzována za vzniku aminobenzimidazolu. Oxidací thiabendazolu vzniká 5-hydroxythiabendazol. Tyto metabolity nemají anthelmintickou aktivitu.

Febantel a netobimin patří mezi prekurzory účinných látek. Po podání léčiva dochází k metabolizaci prekurzoru a vzniku hlavní účinné látky. Febantel se beze zbytku přeměňuje na fenbendazol. Netobimin se z velké části metabolizuje na albendazol a zbytek prekurzoru se vyloučí. (6)

2.2.4. Způsob podání a biologická dostupnost

Benzimidazoly jsou v humánní medicíně podávány perorálně, ve veterinární medicíně také enterálně, intraruminálně, lokálně zevně a přidávané v krmivu. Chemická povaha léčiv umožňuje užití velké řady lékových forem, např. tablety, pasty, suspenze, pelety aj.

Biologická dostupnost závisí na způsobu podání a anthelmintická aktivita závisí na délce přetrvání terapeutické koncentrace léčiva v tělních tekutinách a tkáních. Ze zažívacího traktu se léčiva špatně vstřebávají, to souvisí s jejich špatnou rozpustností

ve vodě. Podání s potravou bohatou na tuky zvyšuje vstřebávání léčiv.

U monogastričních zvířat (např.: pes, kočka, prase) je potřeba podání léčiva opakovat.

U polygastričních zvířat a dalších býložravců (např.: skot, ovce, kůň) postačí jedna dávka léčiva. (5)

2.3. Flubendazol

2.3.1. Vlastnosti flubendazolu

Název: methyl-[5-(4-fluorbenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát (7)

Molekulový vzorec: C₁₆H₁₂FN₃O₃

Molekulová hmotnost: 313,29

Je to bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu 96% a v dichlormethanu. (7)

2.3.2. Mechanismus a spektrum účinku flubendazolu

Flubendazol se používá ve veterinární praxi proti nematodám a cestodám, účinkuje na vývojová i dospělá stadia.

Flubendazol je syntetické anthelmintikum ze skupiny benzimidazol-karbamátů. Účinkuje přes vazbu s β -tubulinovými subjednotkami nezbytnými pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. To má za následek inhibici transportu a metabolismu glukózy. Flubendazol má velmi nízkou afinitu k β -tubulinu buněk ošetřovaných zvířat, což umožňuje podání léčiva zvířeti bez nežádoucích účinků. Účinek flubendazolu je velmi rychlý a nemá žádný vliv na buňky hostitele napadeného parazitem. Parazit je v některých případech schopen flubendazol metabolizovat na neúčinné látky – hydrolyzovaný a redukovaný flubendazol. Stanovením množství metabolitů se určuje rezistence parazita na léčivo.

Flubendazol je velmi těžce rozpustný ve vodných systémech. To má za následek vysoké koncentrace nezměněného léčiva v gastrointestinálním traktu, které odchází stolicí. Jen velmi malá část se absorbuje, metabolizuje v játrech a ledvinách a po té dochází k vyloučení z organismu žlučí nebo močí.

2.3.3. Metabolismus a distribuce flubendazolu

Flubendazol, jako ostatní benzimidazoly, je špatně rozpustný ve vodě a jen velmi malá část se absorbuje. To má za následek vysoké koncentrace nezměněného původního léčiva odcházejícího stolicí z organismu. Metabolizací velmi malé části flubendazolu vzniká hydrolyzovaný flubendazol s aminoskupinou ve struktuře a redukováný flubendazol s hydroxyskupinou. K metabolizaci dochází v játrech a ledvinách, kde jsou metabolity konjugovány do glukosiduronátů nebo sulfátových konjugátů. Metabolity odcházejí hlavně stolicí, velmi malá část odchází s močí s převahou metabolitů a s malým množstvím nezměněné látky. Biologický poločas flubendazolu a jeho metabolitů v tkáních u prasat je 1 až 2 dny. U drůbeže se flubendazol a jeho metabolity nachází v tkáních a plazmě a biologický poločas je 1 až 4 dny. (8)

2.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda sloužící k analýze složitých směsí. Umožňuje jak kvalitativní tak i kvantitativní hodnocení složek směsi. Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna je nepohyblivá – stacionární, zachycuje různou měrou jednotlivé složky analyzované směsi a druhá fáze je pohyblivá – mobilní, která vymývá (eluje) jednotlivé složky směsi ze stacionární fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí.

2.4.1. Objev chromatografie

Název chromatografie vznikl spojením dvou řeckých slov chroma = barva a graphein = psát.

Za objevitele kapalinové chromatografie je považován ruský botanik Michail Semjonovič Cvět. Jeho práce z roku 1903, ve které tuto metodu poprvé popsal a dal jí jméno, se týkala rozdělování rostlinných barviv elucí na sloupci uhličitanu vápenatého. Metoda zůstala dlouho nevyužita. K širokému rozvinutí chromatografie došlo po roce 1941, kdy Martin a Synge uveřejnili základní práce o kapalinové rozdělovací chromatografii na silikagelu a celulóse. Poté popsali Consden, Gordon a Martin papírovou chromatografii. Po druhé světové válce se stala chromatografie nejvýznamnější separační analytickou metodou. (9)

2.4.2. Rozdělení chromatografických metod

Papírová chromatografie je rozdělovací separační metoda. Stacionární fázi tvoří kapalina zachycená ve vhodném filtračním papíře a mobilní fáze je též kapalná. Papír s nanesenými vzorky se vloží do skleněné komory, kde se nasytí stacionární fází. Po té se papír ponoří do misky s mobilní fází a vyvíjí se. Papír se nechá uschnout na vzduchu a po celou dobu se chrání před přímým světlem. (7)

Tenkovrstvá chromatografie je separační metoda, u které stacionární fázi tvoří vhodný materiál (sorbent) nanesený v rovnoměrné tenké vrstvě na skleněný, kovový nebo plastový podklad. Jako sorbenty se nejčastěji používají silikagel (oxid křemičitý), alumina (oxid hlinitý), křemelina aj., mohou se též upravit vhodnou impregnací. Dnes se využívají komerčně vyráběné tenkovrstvé chromatografické desky, kde je sorbent s vhodným pojídkem pevně nanesen na hliníkovou fólii nebo skleněnou desku. Roztoky stanovovaných vzorků se nanášejí před vyvíjením. Chromatogram se nechá vyvíjet v chromatografické komoře ponořený v 2 cm vrstvě mobilní fáze. Při vztlínání mobilní fáze dochází k migraci rozpuštěných látek. Po vystoupaní čela mobilní fáze do předepsané výše se chromatogram vyjme z vyvíjecí komory, nechá se usušit a detekce se provede předepsaným způsobem. (7) (10)

Plynová chromatografie je založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fázi tvoří nosný plyn (dusík nebo helium) pohybující se skrz nebo podél stacionární fáze umístěné v koloně, která je náplňová nebo kapilární. Plynová chromatografie se využívá pro analýzu těkavých látek, které lze zahřátím převést na páru, aniž by došlo k jejich rozkladu. Látky, které by se zahřátím rozložily, před analýzou zreagují s vhodnými derivatizačními činidly za vzniku těkavých derivátů analyzovaných látek. Podle charakteru analyzovaného vzorku je třeba zvolit vhodný typ detektoru, který určuje citlivost analýzy. Signál z detektoru se přenáší do počítače, který ho zpracuje a mimoto řídí chod celého chromatografu. (7) (10)

Vylučovací chromatografie rozděluje molekuly v roztoku podle jejich velikosti. Rozlišujeme gelovou chromatografii, kdy se používá organická mobilní fáze a gelovou filtraci s vodnou mobilní fází. Vzorek se nanáší na kolonu, která je naplněná gelem nebo náplní tvořenou porézními částicemi a je unášen mobilní fází. Nejdříve jsou eluovány největší molekuly, které nejsou v prostoru mezi částicemi náplně zadržovány a nejmenší molekuly jsou eluovány jako poslední. K separaci podle velikosti molekul

dochází v tomto rozmezí, přičemž použitelného dělení se obvykle dosahuje v prvních dvou třetinách tohoto rozmezí. (7)

Superkritická fluidní chromatografie kombinuje výhody plynové a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Mobilní fáze je kapalina v superkritickém nebo v subkritickém stavu. Superkritickou tekutinou se stává plyn při nadkritické teplotě, kdy nemůže být zkapalněn žádným tlakem. Taková kapalina se viskozitou blíží plynné fázi a hustotou kapalné fázi. Obvykle se používá oxid uhličitý. Stacionární fázi v koloně tvoří buď jemně rozptýlené pevné částice (oxid křemičitý nebo porézní grafit), chemicky modifikované stacionární fáze (používané v kapalinové chromatografii) nebo v kapilárních kolonách sesítované kapalné filmy rovnoměrně nanesené na stěnách kolony. Výhodou této metody je její rychlost, která je větší než u kapalinové chromatografie, dobrá rozpouštěcí schopnost mobilní fáze v důsledku vysoké hustoty a díky nízké viskozitě mobilní fáze není nutné k jejímu protlačení kolonou použít extrémně vysoké tlaky. (7)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v současnosti jedna z nejprogresivnějších analytických metod. Jedná se o separační metodu, která umožňuje kvantitativní a kvalitativní hodnocení separovaných složek směsi. Výhodou této metody bývá rychlost, přesnost a spolehlivost analýzy. Současné nejmodernější HPLC chromatografy jsou vybavené automatickými dávkovači a mohou po vhodném nastavení parametrů provádět desítky analýz bez obsluhy.

Při kapalinové chromatografii se analyzovaná směs rozpustí ve vhodném rozpouštědle a zadržuje se v koloně, jejíž náplň tvoří stacionární fázi (silikagel, oxid hlinitý aj.). Kolonou protéká kapalná mobilní fáze, která vymývá postupně všechny složky analyzované směsi. Čas vymytí všech složek analyzované směsi závisí na polaritě každé složky. (10)

2.4.3. Základní pojmy

Chromatogram je grafický nebo jiný záznam koncentrace eluované látky v závislosti na čase nebo objemu. Ideální chromatogram je tvořený řadou gaussovských píků na základní linii. (7)

Pík je část chromatogramu zaznamenávající odezvu detektoru. Představuje jednu analyzovanou složku ze směsi. Plocha píku a výška píku jsou důležité (kvantitativní) charakteristiky určující koncentraci látky ve vzorku.

Retenční čas je čas potřebný pro eluci složky. Měří se od nástřiku vzorku až po maximum chromatografického píku. Je to charakteristický znak pro každou látku.

2.4.4. Části kapalinového chromatografu

- Zásobníky mobilní fáze
- Degasér
- Vysokotlaké čerpadlo
- Dávkovací zařízení
- Chromatografická kolona umístěná v termostatovaném kompartmentu
- Detektor (jeden nebo více)
- Počítač – řídící jednotka

Čerpací zařízení přivádí mobilní fázi ze zásobníků konstantní průtokovou rychlostí. Hadičky a všechny spoje musí být odolné proti vysokému tlaku vyvinutému čerpacím zařízením. Zařízení je schopné přivádět mobilní fázi na kolonu za konstantního složení v průběhu celé analýzy, tzv. **isokratická eluce**, nebo se může složení mobilní fáze v průběhu analýzy měnit, tzv. **gradientová eluce**. (7)

Mobilní fáze se může skládat z vody, methanolu, acetonitrilu, pufrů o různém pH a dalších látek nebo jejich směsí. **Chromatografická kolona** je vyplněna stacionární fází. Kolony jsou nejčastěji dlouhé 10-25 cm o vnitřním průměru 3-5 mm a vyrobené z nerezové oceli nebo ze skla. Jsou naplněny vhodnými sorbenty. Nejčastěji se používají chemicky vázané stacionární fáze. Kromě silikagelu se mohou používat i jiné materiály (oxid křemičitý, oxid hlinitý, porézní grafit aj. (7)). (10)

Většina separací je založena na mechanismu rozdělování, kdy se využívá rozdílné polarity mobilní a stacionární fáze. Při tzv. **normální fázi** je stacionární fáze polárnější

než mobilní fáze. Při **reverzní fázi** (RP HPLC = Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography) je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní.

Dávkovací zařízení umožňuje dávkovat reprodukovatelný objem roztoku vzorku do mobilní fáze před chromatografickou kolonu. Lze použít buď manuální dávkovací ventil s dávkovací smyčkou o fixním objemu nebo autosampler s nastavitelným objemem nástřiku. **Vysokotlaké čerpadlo** „natlačí“ vzorek přes kolonu do **detektoru**, kde dojde k analýze látky.

Citlivost a selektivitu chromatografické analýzy určuje použitý **detektor**.

Užívané detektory (10):

- **Spektrofotometrický detektor:** Jedná se o nejčastěji používaný detektor při HPLC analýze léčiv. Detektor měří absorbanci elektromagnetického záření složek opouštějících kolonu při zvolené vlnové délce (případně více vlnových délkách. K detekci léčiv se nejčastěji využívá UV oblast spektra. Spektrofotometrický detektor je značně citlivý (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze jej použít při gradientové eluci. Podle konstrukčního typu rozlišujeme 4 typy detektorů:
 - UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm) je konstrukčně jednoduchý a cenově nejdostupnější. Zdrojem záření bývá nízkotlaká rtuťová výbojka.
 - UV detektor s proměnnou vlnovou délkou, a to pouze předem danými vlnovými délkami. (11)
 - UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou (měnitelnou dle potřeb v celém dostupném vlnovém rozsahu)
 - Detektor s diodovým polem (photodiode-array detektor, PDA, DAD) řízený počítačem s trojrozměrnou projekcí. Snímá absorpční spektra píků. Je schopen hodnotit léčivo současně při několika vlnových délkách a porovnává poměry absorbancí.
- **Fluorescenční detektor:** Používá se v případech, kdy analyzované léčivo vykazuje fluorescenci. Ne fluoreskující látky lze mnohdy derivatizací převést na fluoreskující deriváty. Fluorescenční detektor je méně univerzální než UV detektor, ale je citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a použitelný při gradientové eluci.

- **Elektrochemický detektor:** Používá se u látek schopných elektrochemické redoxní reakce, která probíhá na fázovém rozhraní elektroda – eluent. Proměřuje elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Elektrochemický detektor je značně citlivý (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), ale většinou jej nelze použít při gradientové eluci.
- **Refraktometrický detektor:** Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem s analyzovanou látkou vytékajícím z kolony. Vyhodnotí prakticky jakoukoliv látku, ale je velmi málo citlivý (10^{-6} g/ml) a je velmi ovlivnitelný teplotou. Nelze ho používat při gradientové eluci.
- Spojení HPLC s **hmotnostní spektrometrií (MS)** je nejmodernější chromatografickou sestavou. V hmotnostním spektrometru jsou molekuly léčiva ionizovány. Nabité částice jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a detektor zaznamenává hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru – hmotnost/počet nábojů). MS detekce je vysoce selektivní, citlivá a poskytuje řadu potřebných údajů k identifikaci analyzovaných léčiv. Významnou nevýhodou tohoto detektoru je jeho vysoká cena.

Analyzovaný vzorek prochází kolonou a detektorem v množství několika mikrolitrů až desítek mikrolitrů. Na koloně jsou jednotlivé složky směsi separovány a následně detekovány v detektoru. Každá složka má na **chromatogramu** vlastní pík. Píky jsou v ideálním případě ostré, symetrické a oddělené až na základní linii. Mohou se objevit odchylky od ideálního píku (11) (dvojitý pík, frontující pík, chvostující pík, negativní pík, uzavřený pík, více píků než očekáváme, méně píků / žádný pík / menší pík než očekáváme). Všechny odchylky mají svojí příčinu a dají se napravit. Plochy a retenční časy píků jsou vyhodnoceny pomocí **výpočetní techniky**.

2.4.5. Kvantitativní zpracování chromatogramů

Kvantitativně vyhodnocovat chromatogramy, tj. určovat koncentrace jednotlivých složek, lze dvojím způsobem: Metodou vnějšího standardu nebo metodou vnitřního standardu (12):

- **Metoda vnějšího standardu** spočívá ve dvojím dávkování. První nástřík obsahuje vzorek analyzovaného roztoku a zaznamená se chromatogram. Druhý nástřík obsahuje tzv. vnější standard – chemickou referenční látku (CRL) nebo jednu ze složek analyzované směsi. Standard se zanalyzuje a zaznamená se chromatogram. Z poměrů ploch píků analyzovaných složek vzorku a vnějšího standardu můžeme vyhodnotit koncentraci jednotlivých složek vzorku.
- **Metoda vnitřního standardu:** k analyzované směsi o známém objemu a neznámé koncentraci se přidá vhodný standard o známém objemu a známé koncentraci. Směs se nastříkuje na kolonu. Látky se musí dobře separovat a vnitřní standard by se měl eluovat v blízkosti stanovované látky, měl by mít podobnou koncentraci a měl by být chemicky stabilní. Z poměrů ploch píků analyzovaných složek vzorku a vnitřního standardu můžeme opět vyhodnotit koncentraci jednotlivých složek vzorku. Tato metoda je méně časově náročná a přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástříku.

2.4.6. Využití HPLC

HPLC analýza má dnes široké využití. Nejdůležitější oblast je analýza léčiv. Pomáhá určovat, o jakou látku se jedná, stanovit její obsah a čistotu. Zodpovídá otázky ohledně stability léčiv, kdy se na chromatogramu nachází hlavní pík analyzovaného léčiva a menší píky vzniklé rozkladnými mechanismy

V přírodních materiálech HPLC analýza pomáhá hodnotit přírodní léčiva, jejich obsah a čistotu.

Dále se může HPLC analýza využívat například ke kontrole životního prostředí.

3. Experimentální část

3.1. Přístrojové vybavení

Veškeré chromatografické analýzy byly naměřeny pomocí kapalinového chromatografu Agilent® Series 1200 SL (Agilent Technologies). Přístroj tvoří vakuový mikrodegaser, binární čerpadlo 1200 SL, autosampler 1200 SL plus, termostat autosampleru, kolonový termostat TCC Infinity 1290, detektor s diodovým polem 1200 SL a fluorescenční detektor 1200. Chromatografický systém byl řízen programem Agilent ChemStation, verze B.04.02. Analýzy byly prováděny pomocí kolony Ascentis® Express C18 100x3mm, 2,7µm (Supelco) a byla využívána předkolona Supelguard® Ascentis™ C18, 20x4,0mm, 3µm (Supelco).

Při přípravě roztoků pufrů a benzimidazolů byly látky navažované na analytických vahách značky Sartorius. Hodnota pH pufrů byla kontrolována a upravována pomocí přístroje pH-metr inoLab 720 (WTW) s pH elektrodou Sentix 61 (WTW).

3.2. Použité chemikálie

Chemikálie použité jako součást mobilní fáze:

- ***Acidum Phosphoricum 85%*** – kyselina fosforečná 85% p. a., H_3PO_4 ,
 $M_r = 98,00$, Lachema Brno
- ***Acetonitril*** – acetonitrile CHROMASOLV® gradient grade for HPLC, CH_3CN ,
 $M_r = 41,05$, Aldrich
- ***Kalii dihydrogenophosphas*** – dihydrogenfosforečnan draselný p. a., KH_2PO_4 ,
 $M_r = 136,09$, Lachema Brno
- ***Methanol*** – methanol CHROMASOLV® gradient grade for HPLC, CH_3OH ,
 $M_r = 32,04$, Aldrich
- ***Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus*** – hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p. a., $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $M_r = 358,14$, Lachema Brno
- ***Ultračistá voda***, připravovaná reverzní osmózou na katedře biochemie farmaceutické fakulty UK (dále jen voda)

Na kalibraci pH metru byly použity komerčně vyráběné roztoky kalibračních pufrů TEP Trace (WTW) o hodnotách pH 4,00 a 7,00.

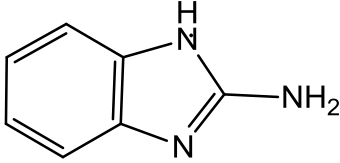
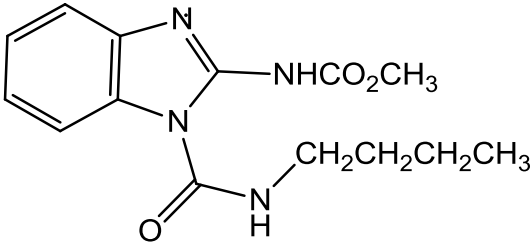
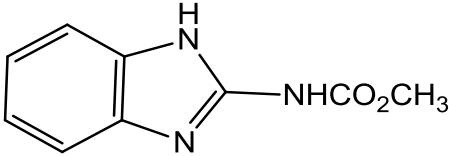
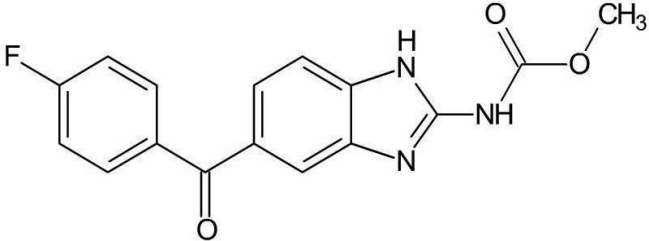
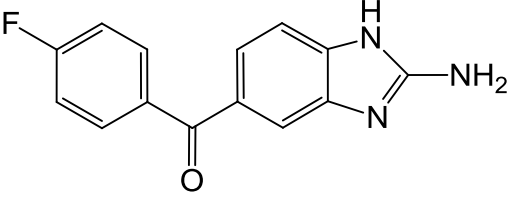
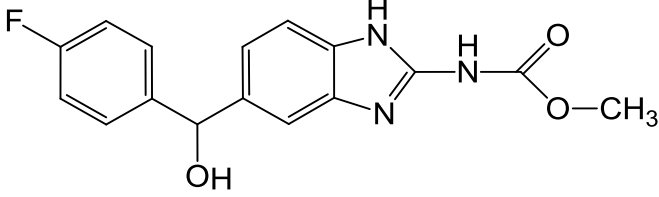
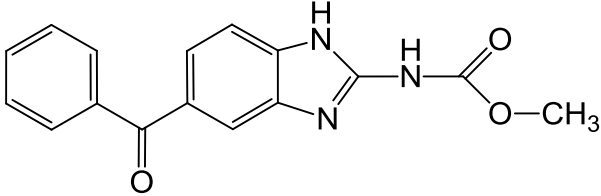
Použité benzimidazoly:

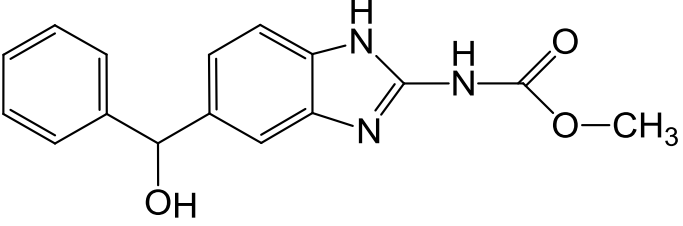
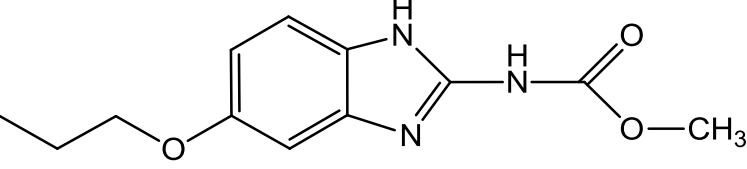
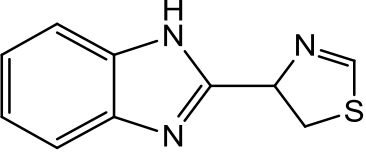
- **2-aminobenzimidazol** – 1*H*-benzimidazol-2-amin, $C_7H_7N_3$, $M_r = 133,15$, Aldrich
- **Benomyl** – methyl *N*-[1-(butylkarbamoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát, $C_{14}H_{18}N_4O_3$, $M_r = 290,32$, Aldrich
- **Carbendazim** – methyl *N*-(1*H*-benzimidazol-2-yl)karbamát, $C_9H_9N_3O_2$, $M_r = 191,19$, Riedel-de Haën
- **Flubendazol** – methyl-[5-(4-fluorbenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát, $C_{16}H_{12}FN_3O_3$, $M_r = 313,29$, Jansen Pharmaceutica
- **Hydrolyzovaný flubendazol** - [(2-amino-1*H*-benzimidazol-5-yl)-4-fluorophenyl]-methanon, $C_{14}H_{10}FN_3O$, $M_r = 255,25$, Jansen Pharmaceutica
- **Redukovaný flubendazol** - [5-(4-fluorofenyl)hydroxymethyl-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát, $C_{16}H_{14}FN_3O_3$, $M_r = 315,3$, Jansen Pharmaceutica
- **Mebendazol** – methyl-(5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)karbamát, $C_{16}H_{13}N_3O_3$, $M_r = 295,30$, Jansen Pharmaceutica
- **Redukovaný mebendazol** – methyl *N*-[5-(1-fenyl-1-hydroxymethyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát, $C_{16}H_{14}N_3O_3$, $M_r = 297,30$, Jansen Pharmaceutica
- **Oxibendazol** – methyl *N*-(6-propoxy-1*H*-benzimidazol-2-yl)karbamát, $C_{12}H_{15}N_3O_3$, $M_r = 249,26$, Sigma
- **Thiabendazol** – 4-(1*H*-benzimidazol-2-yl)-1,3-thiazol, $C_{10}H_{10}N_3S$, $M_r = 201,25$, Riedel-de Haën

Chemikálie použité na rozpuštění benzimidazolů

- **Acetonitril** – acetonitrile CHROMASOLV[®] gradient grade for HPLC, CH_3CN , $M_r = 41,05$, Aldrich
- **Dimethylsulfoxid** – (methansulfinyl)methan, C_2H_6OS , $M_r = 78,13$, Fluka

Tabulka 1: Strukturní vzorce použitých benzimidazolů

Název	Strukturní vzorec
2-aminobenzimidazol	
Benomyl	
Carbendazim	
Flubendazol	
Hydrolyzovaný flubendazol	
Redukovaný flubendazol	
Mebendazol	

Redukovaný mebendazol	
Oxibendazol	
Thiabendazol	

3.3. Příprava pufrů

Součástí testovaných mobilních fází byly roztoky dvou pufrů a kyseliny octové. Jako první byl použit roztok kyseliny octové o koncentraci 0,01 mol/l, jehož pH bylo 3,4.

V druhém případě byl použit fosfátový pufr o pH 7,0. Na analytických vahách bylo odváženo 2,69 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného. Za stálého míchání byl rozpuštěn v asi 450 ml vody. Kyselinou fosforečnou 85% bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,0. Roztok byl přefiltrován pomocí filtračního přístroje Supelco. Zařízení bylo opatřeno filtrem Nylon66 s póry o velikosti 0,45 μm (Supelco) a bylo napojené na membránovou vývěvu KNF, typu N810 (Neuberger), umožňující filtraci za sníženého tlaku. Filtrát byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 500ml a doplněn po značku vodou.

Třetí pufr byl fosfátový pufr o pH 3,0. Na analytických vahách bylo odváženo 1,70 g dihydrogenfosforečnanu draselného. Za stálého míchání byl rozpuštěn v 450 ml vody, kyselinou fosforečnou bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 3,0 a další postup byl stejný jako u fosfátového pufru s pH 7,0.

3.4. Příprava vzorků benzimidazolů

Roztoky jednotlivých benzimidazolů byly připraveny přesným navážením přibližně 1,0 mg látky, rozpuštěním v minimálním potřebném množství dimethylsulfoxidu a následném doplnění na příslušný objem acetonitrilem na koncentraci 0,01 mmol/l v odměrné baňce.

3.5. Metoda měření

Při hledání vhodné mobilní fáze pro analýzu benzimidazolů byly zkoušeny různé poměry mobilních fází. Vzorky benzimidazolů byly nastříknuty vždy 1krát. Kalibrační vzorky s vybranou vhodnou mobilní fází byly nastříknuty 3krát.

Byly vyzkoušeny 4 různé směsi mobilních fází.

- První vyzkoušená mobilní fáze se skládala z kyseliny octové (0,01 mol/l) a acetonitrilu v různých poměrech.
- Druhou mobilní fází tvořil fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) a acetonitril v různých poměrech.
- Třetí mobilní fází tvořila voda a methanol v různých poměrech.
- Čtvrtou mobilní fází tvořil fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH = 3,0) a acetonitril v různých poměrech.

UV detekce u prvních tří mobilních fází byla s vlnovou délkou 290 nm. U poslední mobilní fáze byla použita vlnová délka při UV detekci 246 nm a při fluorescenční detekci excitační vlnová délka byla 290 nm a emisní vlnová délka 320 nm. Hodnoty vlnových délek byly převzaty z předchozích prací. (13) (14) (15)

4. Výsledky a diskuze

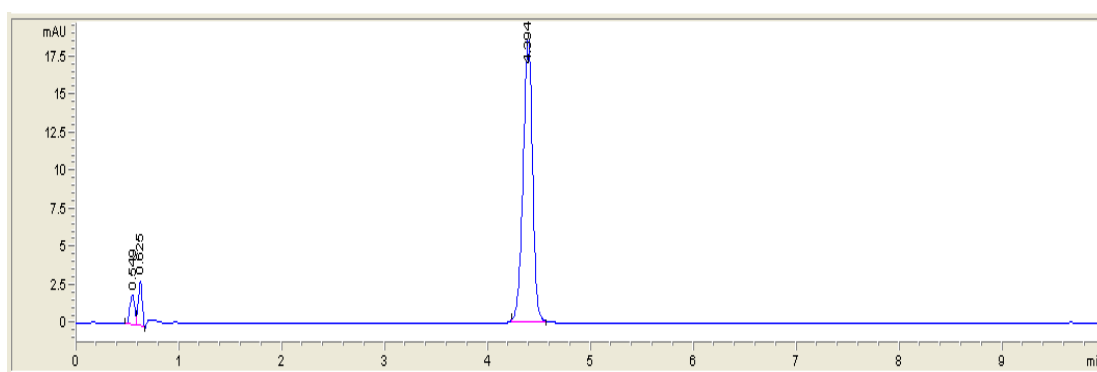
4.1. Měření při použití mobilní fáze kyselina octová (0,01 mol/l) a acetonitril

Na obrázcích č. 1 – 7 jsou vzorové chromatogramy získané měřením s mobilní fází tvořenou kyselinou octovou 0,01 mol/l a ACN v různých poměrech.

Obr. č. 1: Chromatogram FLU; $R_t = 4,39$ min

Mobilní fáze: kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN (70:30, v/v)

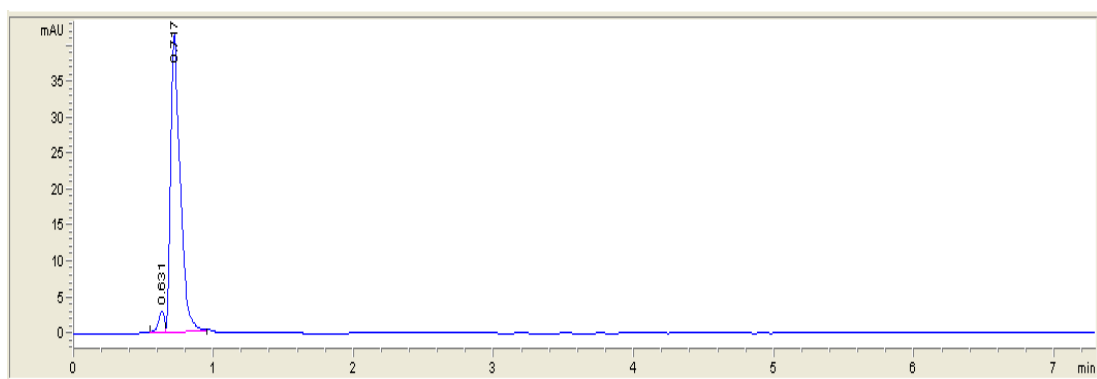
$T_{kolony} = 25^\circ\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Obr. č. 2: Chromatogram FLU-H; $R_t = 0,72$ min

Mobilní fáze: kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN (70:30, v/v)

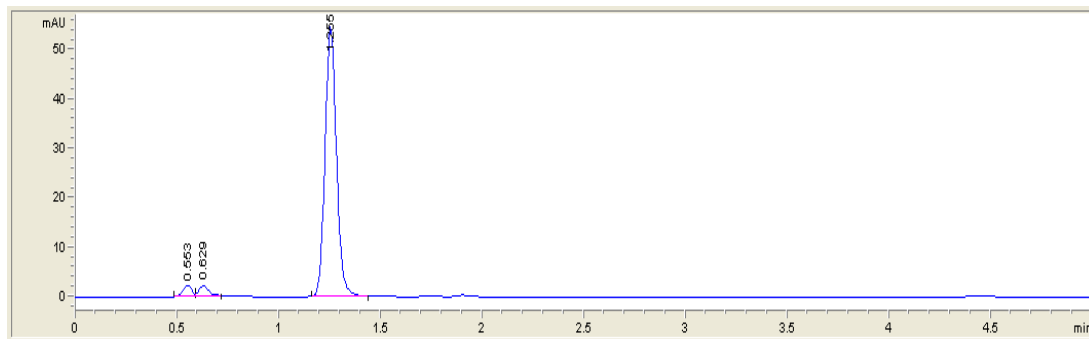
$T_{kolony} = 25^\circ\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Obr. č. 3: Chromatogram FLU-R; $R_t = 1,26$ min

Mobilní fáze: kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN (70:30, v/v)

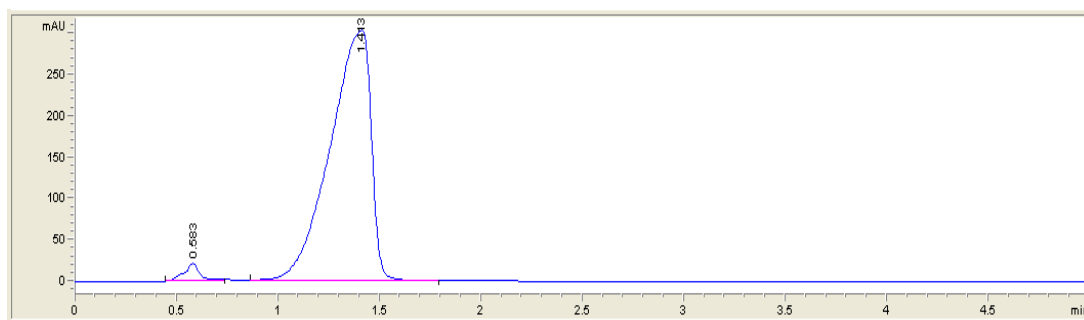
$T_{kolony} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Obr. č. 4: Chromatogram OXI; $R_t = 1,41$ min

Mobilní fáze: kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN (70:30, v/v)

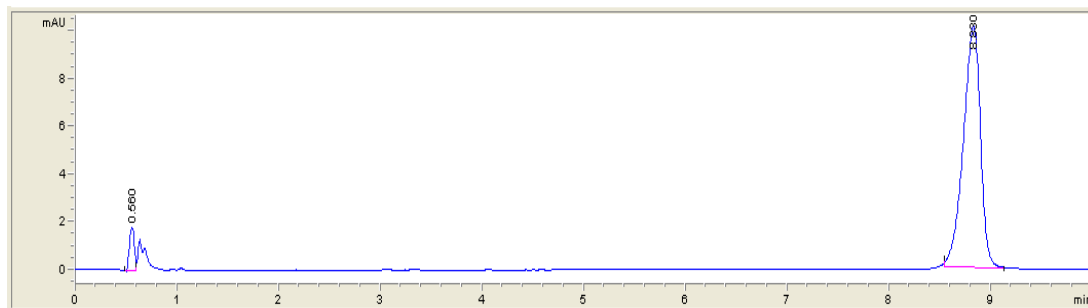
$T_{kolony} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Obr. č. 5: Chromatogram FLU; $R_t = 8,83$ min

Mobilní fáze: kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN (75:25, v/v)

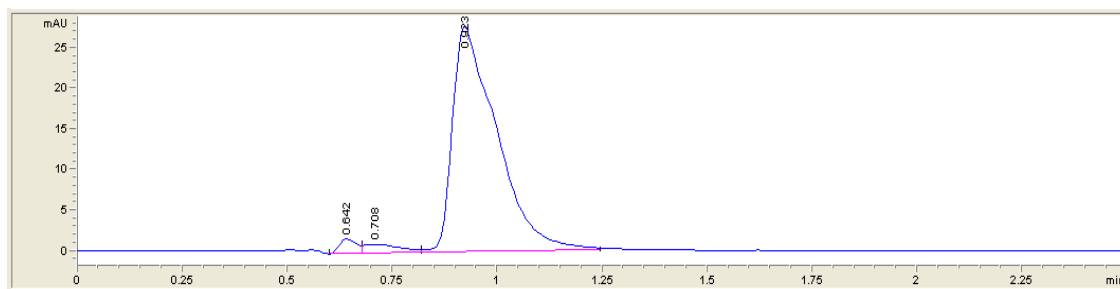
$T_{kolony} = 25^\circ\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Obr. č. 6: Chromatogram FLU-H; $R_t = 0,92$ min

Mobilní fáze: kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN (75:25, v/v)

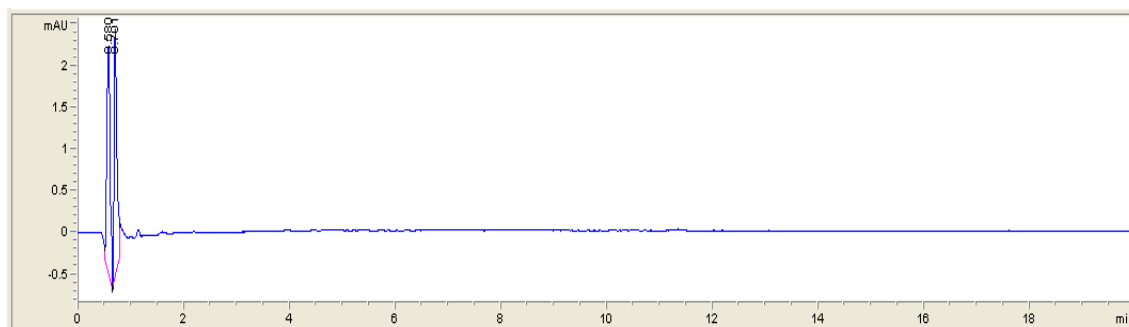
$T_{kolony} = 25^\circ\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Obr. č. 7: Chromatogram FLU; $R_t > 20$ min

Mobilní fáze: kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN (80:20, v/v)

$T_{kolony} = 25^\circ\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Tabulka č. 2: Hodnoty retenčních časů v závislosti na složení mobilní fáze
(kyselina octová (0,01 mol/l) a ACN)

Látka (obr. č.)	R _t (min)	Složení mobilní fáze (v/v)	
		Kyselina octová	ACN
FLU (1)	4,39	70	30
FLU-H (2)	0,72	70	30
FLU-R (3)	1,26	70	30
OXI (4)	1,41	70	30
FLU (5)	8,83	75	25
FLU-H (6)	0,92	75	25
FLU-R	1,88	75	25
OXI	2,04	75	25
FLU (7)	> 20	80	20

Z tabulky je patrné, že retenční čas FLU je velmi dlouhý a retenční časy FLU-R, FLU-H a OXI jsou blízko u sebe a mohly by se překrývat. Z těchto důvodů bylo toto složení mobilní fáze označeno za nevhodné.

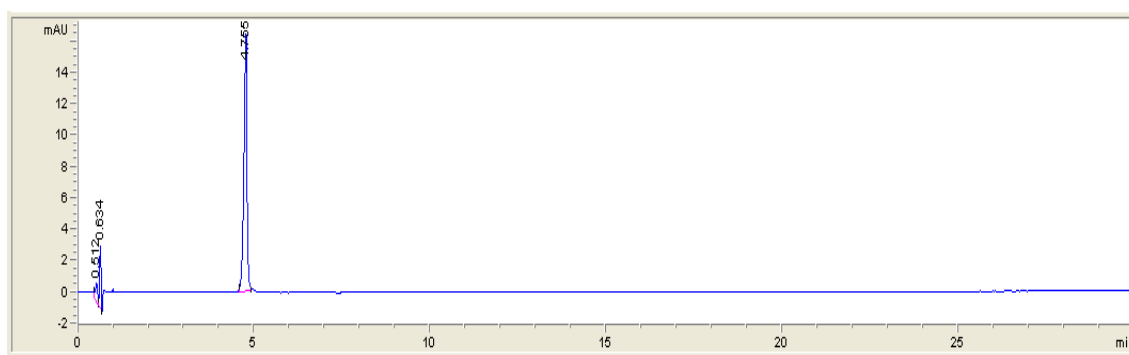
4.2. Měření při použití mobilní fáze fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) a acetonitril

Na obrázcích č. 8 a 9 jsou vzorové chromatogramy získané měřením s mobilní fází tvořenou fosfátovým pufr 0,015 mol/l, pH = 7,0 a ACN v různých poměrech.

Obr. č. 8: Chromatogram FLU; $R_t = 4,76$ min

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) a ACN (70:30, v/v)

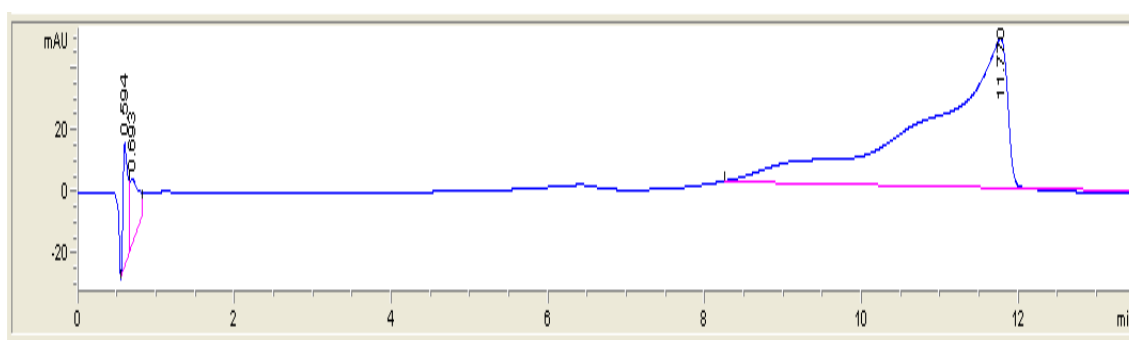
$T_{kolony} = 25^\circ\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Obr. č. 9: Chromatogram OXI, $R_t = 11,77$ min

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) a ACN (80:20, v/v)

$T_{kolony} = 25^\circ\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Tabulka č. 3: Hodnoty retenčních časů v závislosti na složení mobilní fáze (fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) a ACN)

Látka (obr. č.)	R _t (min)	Složení mobilní fáze (v/v)	
		Fosfátový pufr	ACN
FLU (8)	4,76	70	30
FLU-H	> 25	70	30
FLU-R	2,20	70	30
OXI	3,09	70	30
FLU	> 25	80	20
FLU-H	> 25	80	20
FLU-R	9,18	80	20
OXI (9)	11,77	80	20

Složení mobilní fáze tvořené fosfátovým pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) a ACN v poměru 80:20 (v/v) je nevhodné pro velký rozdíl retenčních časů mezi FLU a ostatními benzimidazoly.

Změnou poměru komponent mobilní fáze na 70:30 (v/v) došlo k zajímavému zlepšení. Retenční čas FLU-H však zůstává nevyhovující.

Píky OXI frontují a jsou silně nesymetrické, proto nelze tuto mobilní fázi použít.

FLU-H působil potíže, jeho retenční časy byly příliš dlouhé. Vzhledem k tomu, že tento metabolit se ve vzorcích získaných při studiu anthelmintické rezistence nevyskytuje, bylo upuštěno od jeho sledování a následující pokusy jsou zaměřeny na hledání vhodných vnitřních standardů pro fluorescenční a UV detekci při separaci FLU-R a FLU. Vzhledem k tomu, že separace probíhala na koloně se stacionární fází C18, byla pozornost zaměřena na látky s vhodnou lipofilitou. Jako možná dvojice vnitřních standardů byly vybrány OXI a MBZ.

4.3. Měření při použití mobilní fáze methanol a voda

Na obrázcích č. 10 – 15 jsou vzorové chromatogramy získané měřením s mobilní fází tvořenou methanolem a vodou v různých poměrech při dvou rozdílných teplotách kolony.

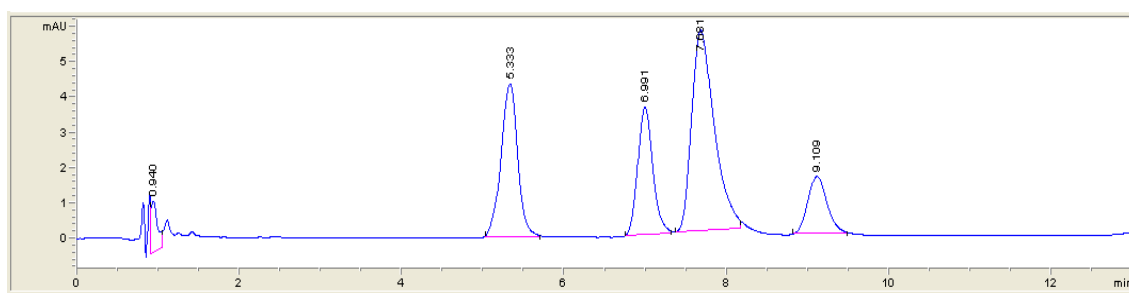
Obr. č. 10: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: methanol a voda (50:50, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min

R_t (FLU-R) = 5,33 min, R_t (OXI) = 6,99 min, R_t (MBZ) = 7,68 min,

R_t (FLU) = 9,11 min



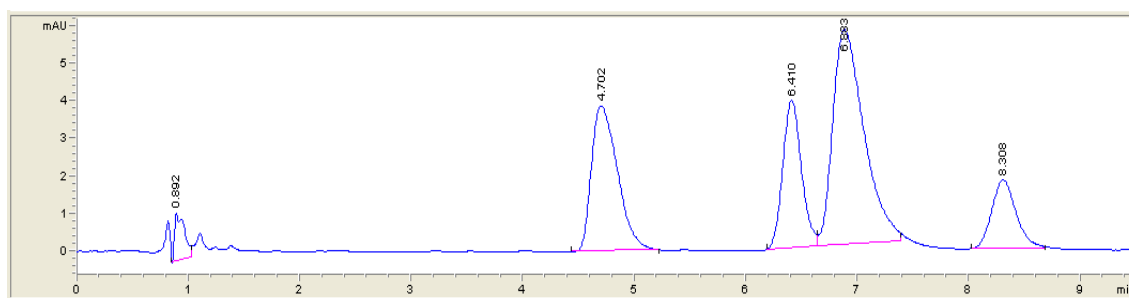
Obr. č. 11: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: methanol a voda (51:49, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min

R_t (FLU-R) = 4,70 min, R_t (OXI) = 6,41 min, R_t (MBZ) = 6,88 min,

R_t (FLU) = 8,31 min

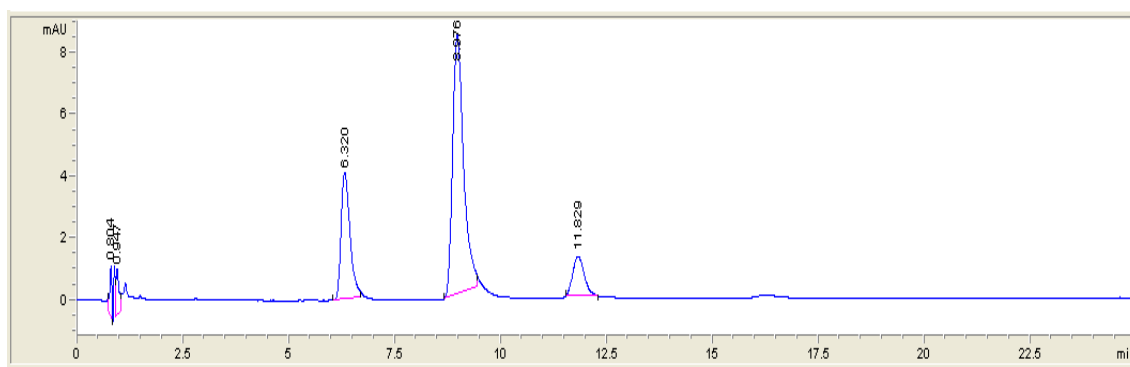


Obr. č. 12: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: methanol a voda (45:55, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 35^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min

R_t (FLU-R) = 6,32 min, R_t (OXI, MBZ) = 8,98 min, R_t (FLU) = 11,83 min



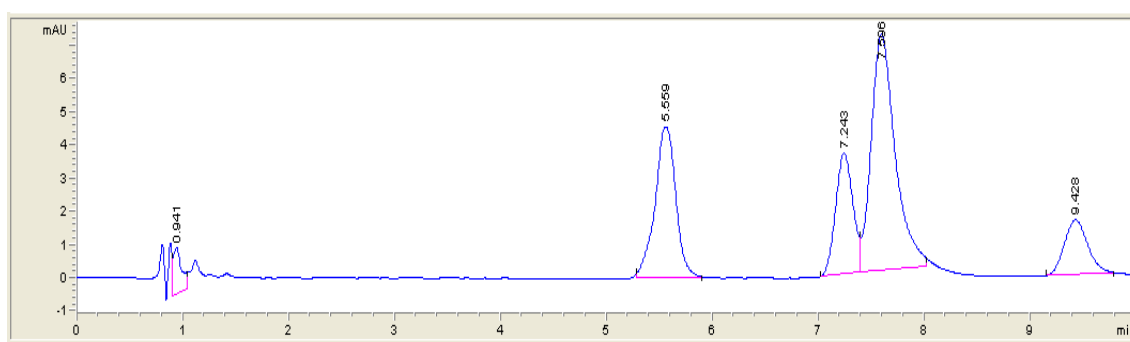
Obr. č. 13: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: methanol a voda (47:53, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 35^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min

R_t (FLU-R) = 5,56 min, R_t (OXI) = 7,23 min, R_t (MBZ) = 7,60 min,

R_t (FLU) = 9,43 min



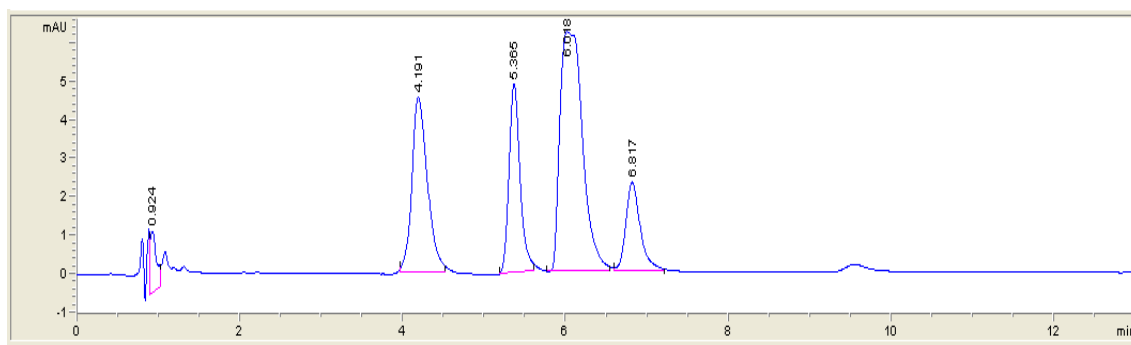
Obr. č. 14: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: methanol a voda (50:50, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 35^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min

R_t (FLU-R) = 4,19 min, R_t (OXI) = 5,37 min, R_t (MBZ) = 6,02 min,

R_t (FLU) = 6,82 min



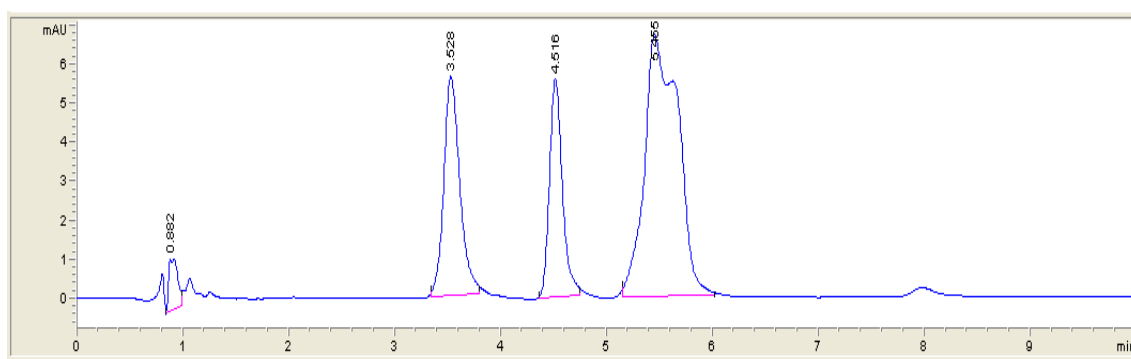
Obr. č. 15: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: methanol a voda (52:48, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 35^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min

R_t (FLU-R) = 3,53 min, R_t (OXI) = 4,52 min, R_t (MBZ, FLU) = 5,46 min

$R_{t1} = 3,53$ min, $R_{t2} = 4,52$ min, $R_{t3} = 5,46$ min



Tabulka č. 4: Hodnoty retenčních časů v závislosti na složení mobilní fáze (methanol a voda) a teplotě kolony

Směs látek	Obr. č.	R _t FLU-R (min)	R _t OXI (min)	R _t MBZ (min)	R _t FLU (min)	Složení mobilní fáze		T _{kolony} (°C)
						Methanol	Voda	
FLU-R	10	5,33	6,99	7,68	9,11	50	50	25
	11	4,70	6,41	6,88	8,31	51	49	25
OXI	12	6,32	8,98		11,83	45	55	35
		5,82	8,20		10,55	46	54	35
MBZ	13	5,56	7,23	7,60	9,43	47	53	35
		5,06	6,64	7,01	8,60	48	52	35
FLU	14	4,19	5,37	6,02	6,82	50	50	35
	15	3,53	4,52	5,46		52	48	35

První měření s mobilní fází ve složení methanol a voda v poměru 50:50 (v/v) a 51:49 (v/v) při teplotě kolony 25°C ukázala, že k analyzování látek dochází po poměrně dlouhé době od začátku analýzy a všechny látky se eluují v těsné blízkosti. Dále je vidět, že retence všech čtyř látek je velice citlivá na malé změny složení mobilní fáze, přičemž při složení methanol a voda v poměru 51:49 (v/v) je již z chromatogramu na obr. č. 12 vidět, že MBZ a OXI nejsou rozděleny.

Zvýšením teploty kolony na 35°C bylo dosaženo zkrácení doby analýzy. Při poměru 45:55 (v/v) a 46:54 (v/v) methanolu a vody v mobilní fázi došlo ke spojení píků OXI a MBZ a celková doba analýzy byla dlouhá. Při složení mobilní fáze methanol a voda v poměrech 47:53 (v/v), 48:52 (v/v) a 50:50 (v/v) byly píky OXI a MBZ oddělené, ale ve velmi těsné blízkosti. Při dalším zvětšení podílu methanolu v mobilní fázi došlo ke spojení píků MBZ a FLU. Z uvedených chromatografických podmínek vychází jako optimální podmínky uvedené u obr. č. 14, avšak i zde všechny látky eluují ve vzájemné velmi těsné blízkosti, což je problematické zejména u dvojice MBZ a FLU.

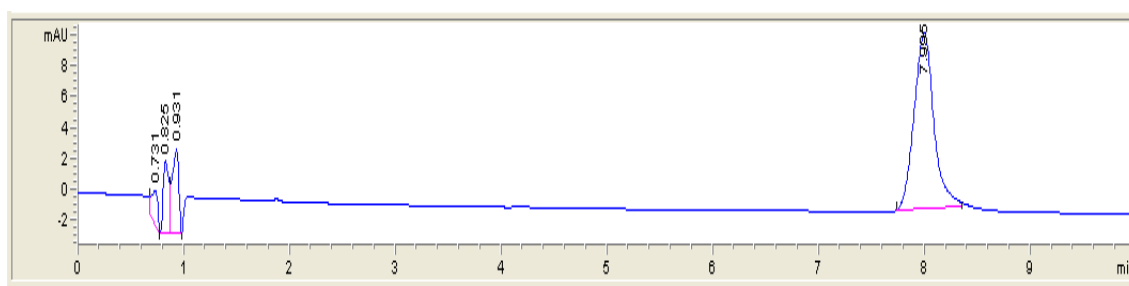
4.4. Měření při použití mobilní fáze fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH = 3,0) a acetonitril

Na obrázcích č. 16 a 17 jsou vzorové chromatogramy získané měřením s mobilní fází tvořenou fosfátovým pufr 0,025 mol/l, pH = 3,0 a ACN v různých poměrech.

Obr. č. 16: Chromatogram FLU; $R_t = 7,99$ min

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (72:28, v/v)

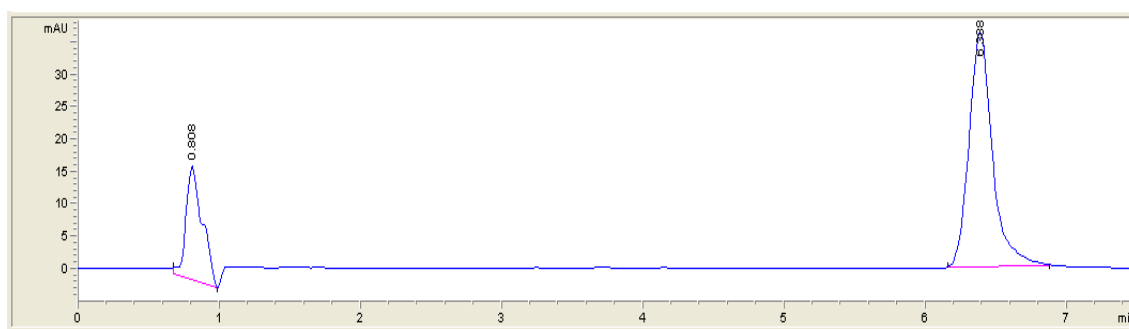
$T_{kolony} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min,



Obr. č. 17: Chromatogram FLU; $R_t = 6,39$ min

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)

$T_{kolony} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min



Na obr. č. 16 a 17 jsou chromatogramy FLU s malou změnou v poměru složek mobilní fáze fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN. FLU se při složení mobilní fáze fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN v poměru 72:28 (v/v) eluuje později než s mobilní fází v poměru 70:30 (v/v). Pík FLU s mobilní fází s větším obsahem fosfátového pufru má mnohem menší plochu při stejném objemu nástřiku vzorku. Proto další měření byla zaměřena na mobilní fází fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN v poměru 70:30 (v/v).

Na obrázcích č. 18 a 19 jsou vzorové chromatogramy získané měřením s mobilní fází tvořenou fosfátovým pufr 0,025 mol/l, pH = 3,0 a ACN v poměru 70:30 (v/v).

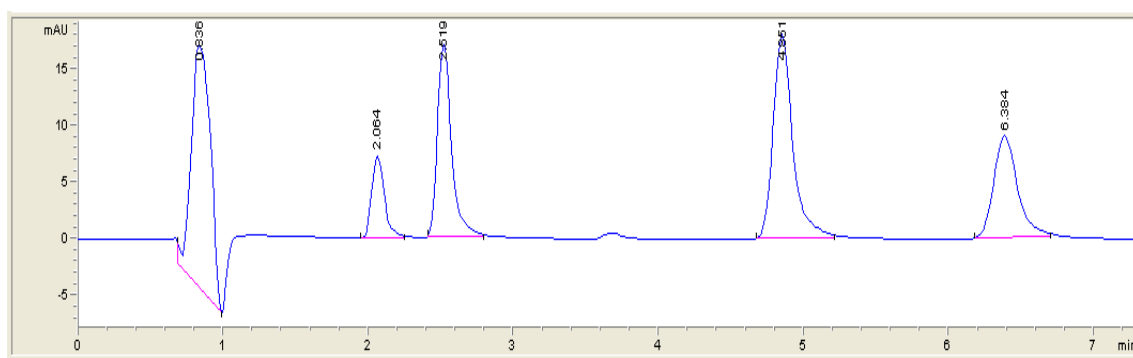
Obr. č. 18: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,700 ml/min

R_t (FLU-R) = 2,06 min, R_t (OXI) = 2,52 min, R_t (MBZ) = 4,85 min,

R_t (FLU) = 6,38 min



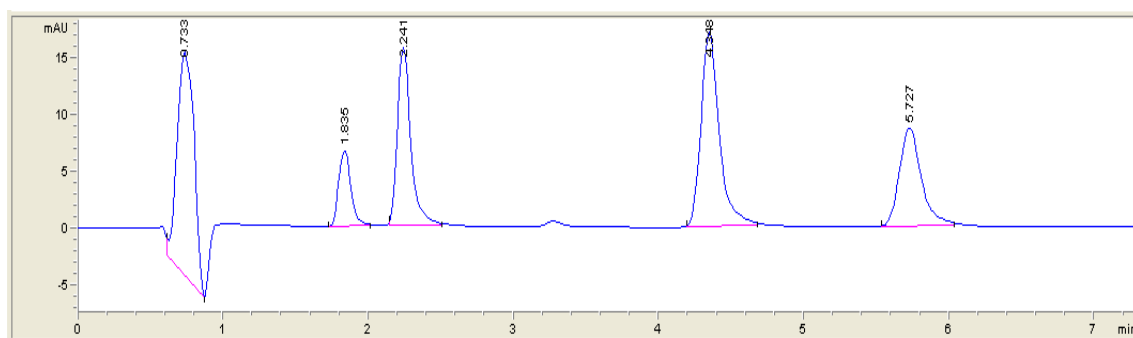
Obr. č. 19: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,800 ml/min

R_t (FLU-R) = 1,86 min, R_t (OXI) = 2,24 min, R_t (MBZ) = 4,35 min,

R_t (FLU) = 5,73 min



Tabulka č. 5: Hodnoty retenčních časů v mobilní fázi (fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)) v závislosti na změně průtoku kolonou

Látka (obr. č.)	R _t (min)				Průtok kolonou (ml/min)
FLU-R	2,05				0,700
OXI	2,52				0,700
MBZ	4,85				0,700
FLU (17)	6,39				0,700
Směs látek (obr. č.)	R _t FLU-R (min)	R _t OXI (min)	R _t MBZ (min)	R _t FLU (min)	Průtok kolonou (ml/min)
FLU-R OXI MBZ FLU (18)	2,06	2,52	4,85	6,38	0,700
FLU (19)	1,84	2,24	4,35	5,73	0,800

Malé zvýšení průtoku mobilní fáze kolonou (z 0,700 ml/min na 0,800 ml/min) zkrátí dobu analýzy o půl minuty bez negativního ovlivnění separace látek. Složení této mobilní fáze, která je na základě výsledků této diplomové práce optimální pro daný účel, je stejné jako v případě původní metody prováděné na klasické koloně s náplní stacionární fáze C18 (1). Právě vzhledem k tomu, že typ stacionární fáze je shodný v původní metodě i v této práci, není shoda složení mobilních fází tolik překvapující. Předchozí testování jiných mobilních fází však nebylo samoúčelné, neboť došlo ke změně vnitřních standardů, a proto nebylo jisté, zda bude původní mobilní fáze vyhovovat.

S vybranou mobilní fází byly dále naměřeny kalibrační křivky pro oba sledované analyty (FLU-R a FLU) a byly provedeny experimenty, při nichž byly měněny některé parametry analýzy za účelem zkrácení doby analýzy při zachování dostatečné separace.

Tabulka č. 6: Hodnoty retenčních časů zkoušených vnitřních standardů s mobilní fází (fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v))

Látka	R _t (min)
Albendazol sulfoxid	1,8
Benomyl	1,85
Redukovaný mebendazol	1,9
Carbendazim	1,9
Thiabendazol	2,05
2-aminobenzimidazol	2,3
Albendazol sulfon	2,5
Oxibendazol	2,5
Mebendazol	4,7
Albendazol	8,7

Z tabulky retenčních časů vnitřních standardů je patrné, že látky albendazol sulfoxid, benomyl, carbendazim, redukovaný mebendazol, thiabendazol a 2-aminobenzimidazol se eluují příliš brzy a píky standardů by mohly zasahovat do píku FLU-R.

Albendazol se eluuje velmi pozdě. Tento retenční čas by výrazně prodloužil dobu analýzy FLU a jeho derivátů.

Jako vhodné vnitřní standardy se ukázaly albendazol sulfon, OXI a MBZ. Neprodłużují dobu analýzy a píky standardů nezasahují do analyzovaných látek. Albendazol sulfon je nevhodný vnitřní standard z důvodu své vysoké ceny. OXI a MBZ jsou stálé látky, jejichž retenční časy zcela vyhovují pro analýzu FLU a jeho metabolitů s mobilní fází fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN v poměru 70:30 (v/v).

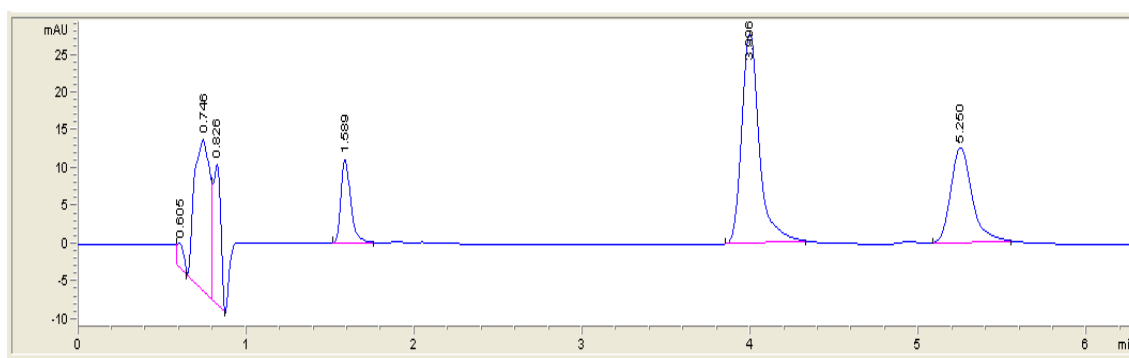
Na obrázcích č. 20 a 21 jsou vzorové chromatogramy využité pro sestavení kalibračních křivek.

Obr. č. 20: Chromatogram směsi FLU-R, MBZ a FLU

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,800 ml/min

$R_t(\text{FLU-R}) = 1,59 \text{ min}$, $R_t(\text{MBZ}) = 3,99 \text{ min}$, $R_t(\text{FLU}) = 5,25 \text{ min}$



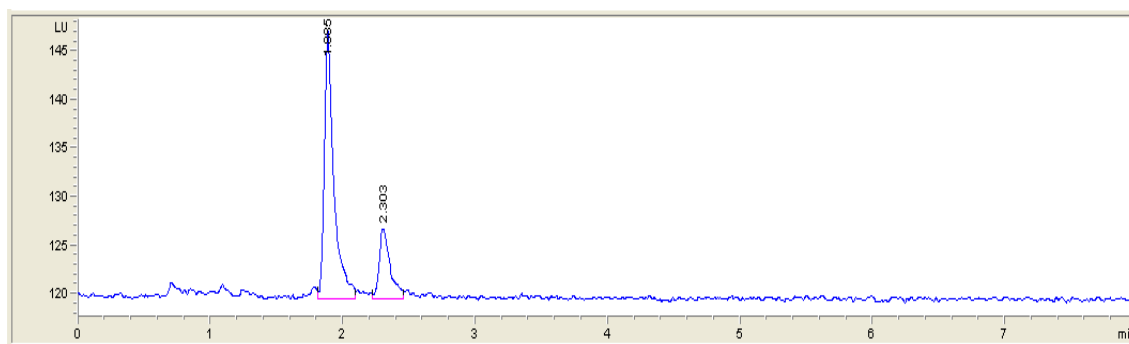
Obr. č. 21: Chromatogram směsi FLU-R a OXI

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,800 ml/min;

fluorescenční detekce: $E_x = 290 \text{ nm}$ a $E_m = 320 \text{ nm}$

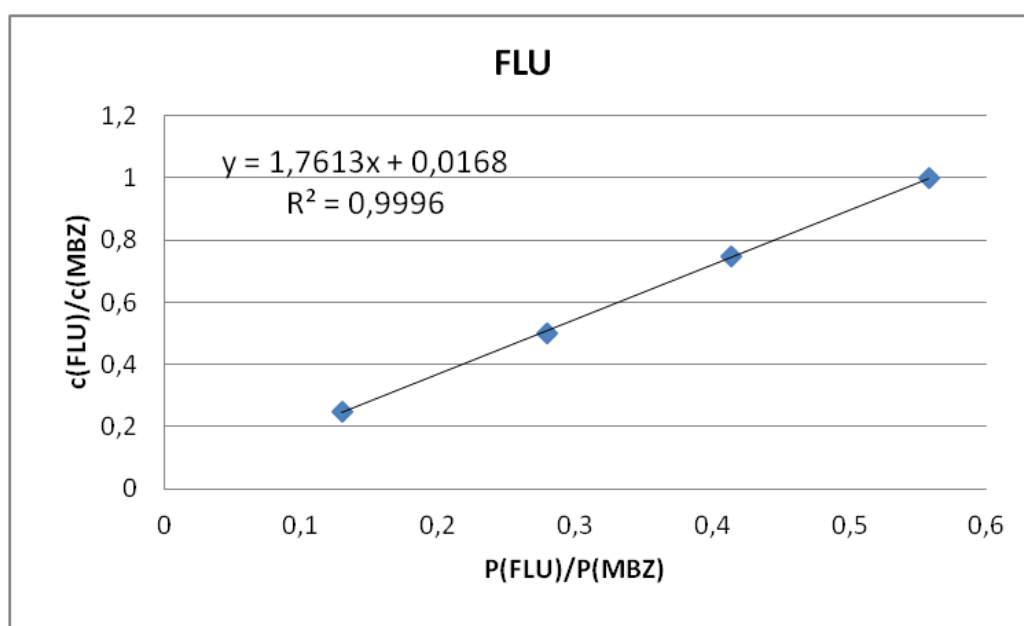
$R_t(\text{FLU-R}) = 1,89 \text{ min}$, $R_t(\text{OXI}) = 2,30 \text{ min}$



Tabulka č. 7: Koncentrace a plochy píků FLU a MBZ ve směsích použitých pro stanovení kalibrační křivky pro FLU

Směs č.	Koncentrace FLU ($\mu\text{mol/l}$)	P FLU	Koncentrace MBZ ($\mu\text{mol/l}$)	P MBZ
1	0,94	27	3,76	206
2	1,88	57	3,76	202
3	2,82	85	3,76	205
4 (obr. č. 20)	3,76	114	3,76	204

Graf č. 1: Kalibrační křivka FLU za použití vnitřního standardu MBZ při UV detekci



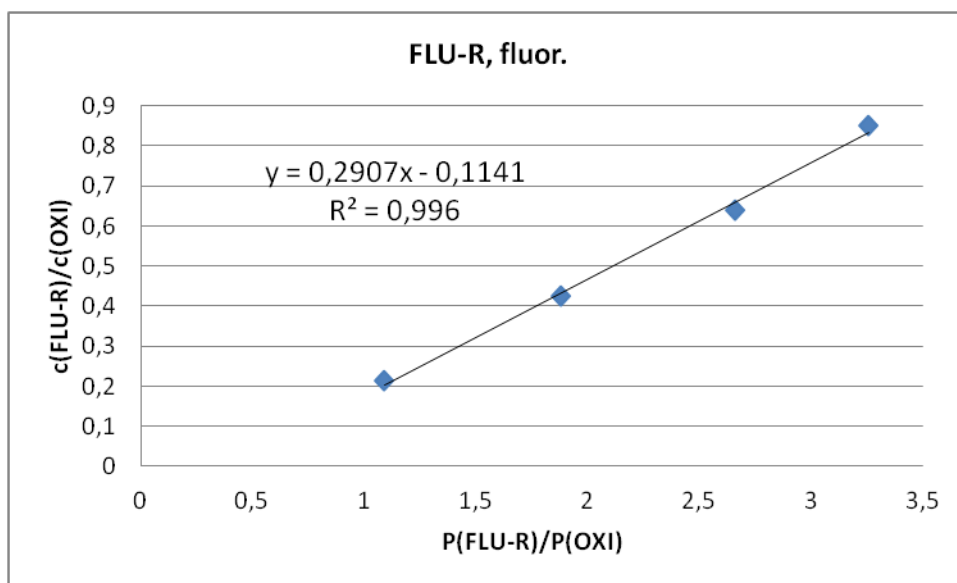
Chromatografické podmínky při měření kalibrační křivky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu.

Plochy píků FLU a MBZ pro kalibrační křivku FLU uvedené v tabulce č. 6 jsou průměrné hodnoty získané ze tří měření.

Tabulka č. 8: Koncentrace FLU-R a OXI ve směsích použitých pro stanovení kalibrační křivky pro FLU-R

Směs č.	Koncentrace FLU-R ($\mu\text{mol/l}$)	P FLU-R	Koncentrace OXI ($\mu\text{mol/l}$)	P OXI
1	0,0085	49	0,04	45
2	0,017	77	0,04	41
3	0,0255	109	0,04	41
4 (obr. č. 21)	0,034	140	0,04	43

Graf č. 2: Kalibrační křivka FLU-R za použití vnitřního standardu OXI při fluorescenční detekci



Chromatografické podmínky měření kalibrační křivky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu.

Plochy píků FLU-R a OXI pro kalibrační křivku FLU-R uvedené v tabulce č. 7 jsou průměrné hodnoty získané ze tří měření.

Obě kalibrační křivky jsou naměřeny s modelovými kalibračními vzorky, které nebyly připraveny v biologickém materiálu, protože tento materiál nebyl k dispozici. Je tak ověřena linearita odezvy ovšem bez případného vlivu předseparace (LLE, SPE).

Na obrázcích č. 22 a 23 jsou vzorové chromatogramy získané měřením s mobilní fází tvořenou fosfátovým pufr 0,025 mol/l, pH = 3,0 a ACN v poměru 70:30 (v/v) v závislosti na změně jedné charakteristiky.

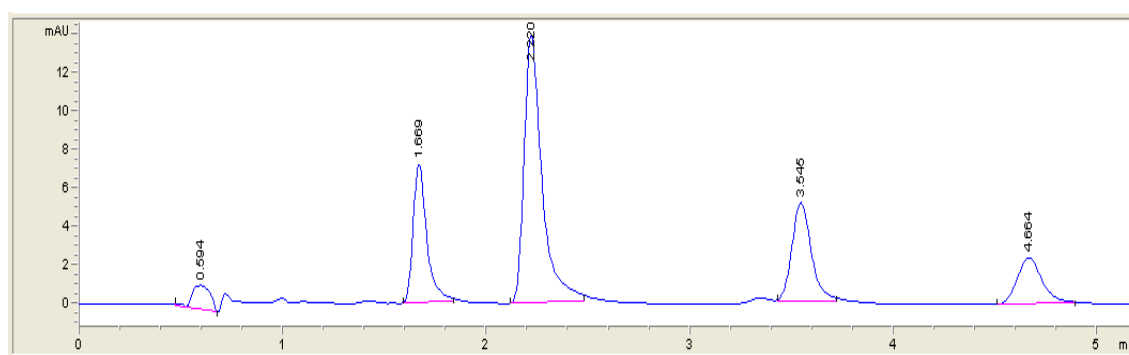
Obr. č. 22: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25^{\circ}\text{C}$; průtok = 1,000 ml/min

R_t (FLU-R) = 1,67 min, R_t (OXI) = 2,22 min, R_t (MBZ) = 3,55 min,

R_t (FLU) = 4,66 min



Zvýšením průtoku mobilní fáze kolonou na 1,000 ml/min se docílilo zkrácení doby analýzy na necelých 5 min. Benzimidazoly se zcela separují až na základní linii. Tuto změnu je možné využít pro zkrácení doby analýzy. V případě použití těchto podmínek u reálných vzorků by však bylo nutné ověřit, že eventuální píky ze slepého vzorku nezasahují do píků analytů a vnitřních standardů.

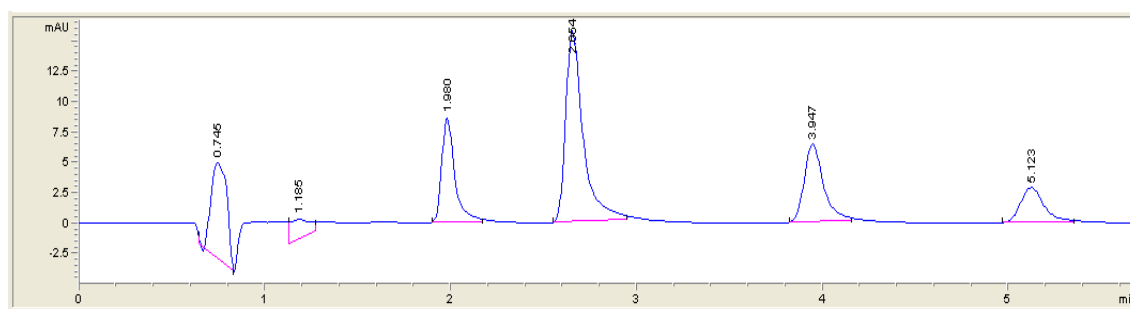
Obr. č. 23: Chromatogram směsi FLU-R, OXI, MBZ a FLU

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (70:30, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 35^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,800 ml/min

$R_t(\text{FLU-R}) = 1,98 \text{ min}$, $R_t(\text{OXI}) = 2,65 \text{ min}$, $R_t(\text{MBZ}) = 3,95 \text{ min}$,

$R_t(\text{FLU}) = 5,12 \text{ min}$



Zvýšením teploty kolony z 25°C na 35°C se mírně zkrátila doba analýzy.

Zachovala se úplná separace píků benzimidazolů až na základní linii. Zvýšení teploty kolony lze využít ke zkrácení doby analýzy, které není ale tak výrazné jako u zvýšení průtoku mobilní fáze kolonou.

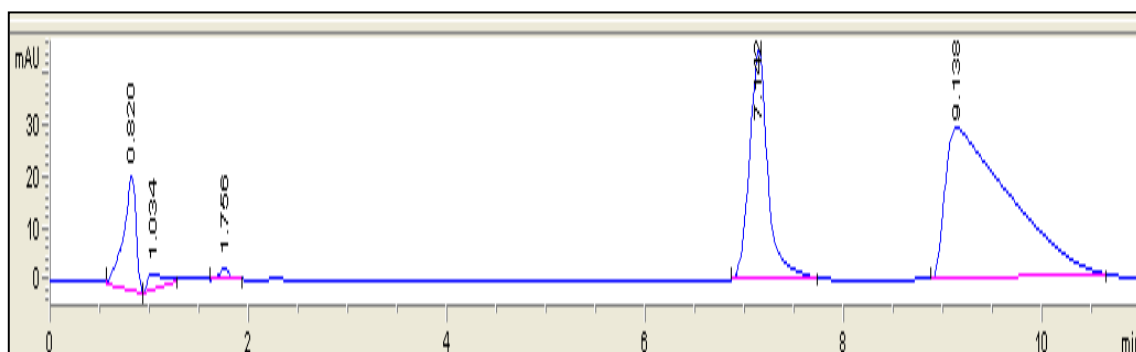
Obr. č. 24: Chromatogram reálného vzorku

Mobilní fáze: fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH=3,0) a ACN (72:28, v/v)

$T_{\text{kolony}} = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; průtok = 0,800 ml/min

Detekce: UV 246 nm

R_t (FLU) = 7,14 min, R_t (verapamil) 9,14 min



Na obr. 24 je příklad chromatogramu reálného vzorku naměřeného poté, co byla vyvinutá metoda upravena pro zjištění koncentrace FLU v jistých biologických vzorcích (15). Úprava metody spočívala ve velkém objemu nástřiku (100 μl), který byl nutný, neboť byly očekávány velmi nízké koncentrace FLU, a ve změně složení mobilní fáze, protože bylo nutné odseparovat pík verapamilu. Stanovení FLU bylo v tomto případě prováděno metodou vnějšího standardu, verapamil nebyl stanovován, proto nevádí chvostování jeho píku. Za povšimnutí stojí, že i při velkém objemu nástřiku je pík FLU poměrně štíhlý a symetrický. To lze vysvětlit příznivými vlastnostmi core-shell kolon. (16) (17) (18)

Kvantitativní limit stanovení FLU byl určen na 0,100 $\mu\text{mol/l}$, detekční limit na 0,030 $\mu\text{mol/l}$. Oba limity byly stanoveny ze šumu základní linie.

5. Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo převést starší metodu HPLC analýzy flubendazolu a jeho metabolitů na metodu za použití core-shell kolony Ascentis® Express C18 (10 cm × 3,0 mm; 2,7 μm). Pro tuto metodu bylo také zapotřebí najít vhodné vnitřní standardy pro dva různé způsoby detekce, detekci flubendazolu pomocí UV detektoru a detekci redukovaného flubendazolu pomocí detektoru fluorescenčního.

K tomuto účelu byly zkoušeny čtyři různé mobilní fáze. Tři z nich bylo nutné z různých důvodů vyloučit. Nakonec byla vybrána jedna vhodná mobilní fáze – fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH = 3,0) a acetonitril v poměru 70:30 (v/v). Tato mobilní fáze byla používána i v původní metodě s klasickou kolonou a jiným vnitřním standardem a je pozoruhodné, že i přes zásadní změnu vnitřního standardu je tato mobilní fáze opět vhodnou volbou. Použití původní mobilní fáze zároveň umožnilo využít původní detekční podmínky.

V průběhu testování různých mobilních fází byly zkoušeny různé látky (benzimidazoly), které by se mohly hodit jako vnitřní standard. Nakonec se jako vhodné vnitřní standardy osvědčily dvě látky, mebendazol pro DAD detekci a oxibendazol pro fluorimetrickou detekci. Oba vnitřní standardy se zcela separují ze směsí a nezasahují do píků analyzovaných látek.

Složení mobilní fáze – fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH = 3,0) a acetonitril v poměru 70:30 (v/v) s vnitřními standardy – mebendazol a oxibendazol bylo úspěšně vyzkoušeno několika měřeními a sestavením kalibračních křivek. Úspěšně také proběhla změna jednoho parametru analýzy. Zvýšení průtoku mobilní fáze kolonou z 0,700 ml/min na 1,000 ml/min zkrátilo dobu analýzy pod 5 minut. Také zvýšení teploty kolony na 35°C vedlo ke zkrácení analýzy. Využití modifikovaných podmínek s biologickými vzorky by bylo nutné ještě ověřit.

6. Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
FLU	flubendazol
FLU-H	hydrolyzovaný flubendazol
FLU-R	redukovaný flubendazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
MBZ	mebendazolu
OXI	oxibendazolu
P	plocha píku
R _t	retenční (eluční) čas
T _{kolony}	teplota kolony

Citovaná literatura

1. **Nobilis, M. et al.** *J. Chromatogr. A* 1149, 112 - 120. 2007.
2. **Lincová, D. a Farghali, H. et al.** *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2007. ISBN: 978-80-7262-373-0.
3. **Hartl, J. et al.** *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum - Univerzita Karlova v Praze, 2008. ISBN: 978-80-246-1169-3.
4. **Lamka, J. a Ducháček, L.** *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha: Karolinum, 2008. ISBN: 978-80-246-1243-0.
5. **Lamka, J. a Ducháček, L.** *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2007. ISBN: 80-246-1263-1.
6. **Danaher, M. et al.** *J. Chromatogr. B*, 845, 1–37. 2007.
7. *Český lékopis 2009 - Doplněk 2010*. Praha: Grada, 2010.
8. Mikro-verze AISLP. *Automatizovaný informační systém léčivých přípravků*. verze 2011.2 platná k 1.4.2011 pro MS Windows.
9. **Zýka, J. et al.** *Analytická příručka, díl I*. Praha: SNTL - nakladatelství technické literatury, 1979.
10. **Klimeš, J. et al.** *Kontrola léčiv I*. Praha: Karolinum - Univerzita Karlova v Praze, 2002. ISBN: 80-246-0419-1.
11. **Douša, M.** HPLC.CZ. [Online] 24. 01 2011. [Citace: 09. 03 2012.] www.hplc.cz.
12. **Klimeš, J. et al.** *Kontrola léčiv II*. Praha: Karolinum - Univerzita Karlova v Praze, 2004. ISBN: 80-246-0818-9.
13. **Kubíček, V. et al.** *Chromatographia* 68, 865-867. 2008.
14. **Vokřál, I. a Křížová, V. et al.** *Open Parasitology Journal* 4, 24 – 28. 2010.
15. **Vokřál, I. a Bártíková, H. et al.** *Parasitology* 139, 1 – 8. 2012.
16. **Cunliffe, J. M. et al.** *J. Sep. Sci.* 30, 3104 – 3109. 2007.
17. **Kaczmariski, K., Guiochon, G.** *Anal. Chem.* 79, 4648 – 4656. 2007.
18. **Fekete, S. et al.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 703 – 709. 2009.